

A DAGANATOS BETEGELLÁTÁS INNOVATÍV FEJLESZTÉSE GENOMIKAI MÓDSZEREKKEL

Beszámoló a Nemzeti Onkológiai Konzorcium 2008. évi tevékenységéről

Tímár József¹, Kásler Miklós¹, Heringh Alexandra², Soós Miklós⁷,
Mathiász Dóra⁴, Romány Anna³, Józsa Adrienn⁵, Szilák László⁸, Forrai Tamás⁶, Patthy László⁹,
Kovács Gábor¹⁰

¹Országos Onkológiai Intézet, Budapest, ²AstraZeneca Kft, Törökbálint, ³Janssen-Cilag Kft, Törökbálint, ⁴GlaxoSmithKline Kft, Budapest, ⁵Roche (Magyarország) Kft, Budaörs, ⁶Zenon Bio Kft, Szeged, ⁷AuroScience Kft, Budapest, ⁸Szilák Labor Kft, Szeged ⁹MTA Enzimológiai Intézete, Budapest, ¹⁰Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet, Budapest

A fejlesztés 3. évében 8 új molekuláris diagnosztikai szolgáltatást fejlesztett ki a Konzorcium az emlőrák, vastagbélrák, tüdőrák, GIST és melanoma prognosztikája és predikciója számára. A kutatási periódusban 2 szabadalmat jelentett be új típusú mitogén/motogén jelpálya-módosításra. Emberi daganatok preklínikai modelljein az eritropoetin erekre gyakorolt hatásainak funkcionális képkötő vizsgálatokkal történő mérését dolgozta ki. Humán melanoma modelleken a szisztémás progresszió genomikai jellemzőit határozta meg. Magyar Onkológia 53:321–334, 2009

Kulcsszavak: genomika, géndiagnosztika, célzott terápia, kutatás-fejlesztés, onkológia

In the 3rd year of the program 8 new molecular diagnostic services have been introduced to clinic in the management of breast-, lung-, colorectal cancers as well as in GIST and melanoma. Two patents have been filed for innovative modulation of mito/motogenic signaling pathways in cancer cells. In preclinical models of human cancer a functional imaging technique was developed to detect vascular effects of erythropoietin. Using a genomic approach, the sequential changes in human melanoma during systemic dissemination were determined revealing several novel potential prognostic factors and some interesting novel targets for therapy. Tímár J, Kásler M, Heringh A, Soós M, Mathiász D, Romány A, Józsa A, Szilák L, Forrai T, Patthy L, Kovács G. Developments in cancer management by innovative genomics. 2008 report of the National Cancer Consortium. Hungarian Oncology 53:321–334, 2009

Keywords: genomics, gene diagnostics, targeted therapy, R&D, oncology

Levelezési cím:

Dr. Tímár József
Semmelweis Egyetem
II. sz. Patológiai Intézet
1091 Budapest
Üllői út 93.
Telefon/Fax:
(06-1) 215-6921
E-mail:
jtimar@korb2.sote.hu

Megjegyzés:

A ⁹ és ¹⁰ számmal jelölt résztvevők alvállalkozók.

1. SZÁMÚ PROGRAMCSOMAG: MOLEKULÁRIS DIAGNOSZTIKAI SZOLGÁLTATÁSOK FEJLESZTÉSE

Örökletes daganatok predikciója és detektálása Magyarországon (Dr. Oláh Edit – Országos Onkológiai Intézet; Dr. Forrai Gábor – Zenon Bio Kft)

Molekuláris profilvizsgálatok emlő- és hererákban

57 nem polipózis talaján kifejlődő vastagbélrák-szindrómás esetben meghatároztuk az MLH1 és MSH2 gének mutációs státuszát. A gének valamennyi kódoló szekvenciájára kiterjedő mutációvizsgálatot a hagyományos SSCP, HDA és közvetlen DNS-szekvenálási módszerekkel végeztük.

Kilenc, emlőrákkal diagnosztizált férfibeteg esetében 93 gén expressziós profilját határoztuk meg abból

a célból, hogy azonosítsuk az e ritka betegség kialakulásában szerepet játszó legfontosabb jelátviteli útvonalakat, és jellemezzük az ezekben szereplő gének kifejeződésének megváltozásait. A mintákban a gének kifejeződését a nagy pontosságú TaqMan Low Density Array (TLDA) módszerrel vizsgáltuk, az eredmények értékelése és a tumoros-egészséges mintákon nyert eredmények statisztikai összehasonlítása a StatMiner szoftverrel történt.

A konzorcium 6. számú kisvállalkozó partnerével (Zenon Bio Kft) szoros együttműködésben sikerült bevezetni két új mutációelemző módszert, a DHPLC és a nagy genomi deléciók azonosítására szolgáló MPLA módszert, abból a célból, hogy javítsuk az öröklött génmutációk költségkímélő kimutatását a BRCA1/2, APC, STK11, MYH, MLH1 és MSH2 génekre. Ez úgy volt lehetséges, hogy a kisvállalkozó partner alkalmazásában álló Kovács András biológust franciaországi

továbbképzésre küldte, és a hazahozott módszereket alkalmaztuk a Wave3500 mutációdetektáló készülékre. A készülék folyamatos működését, szervizelését szintén az ipari partner biztosította.

Nem polipózis talaján kialakuló örökletes vastagbélrák (HNPCC, Lynch-szindróma) hajlamosító géneinek elemzése

57 család kombinált mutációvizsgálata (HDA/SSCP/MLPA/szekvenálás) alapján ezek 31,6%-a (18/57) hordozott patogén mutációt. Az azonosított 18 mutáció fele az MLH1, másik fele az MSH2 génben volt. A vizsgált populációban minden mutáció csak egyszer fordult elő, azaz alapító hatással nem találkoztunk. A detektált mutációk fele új, azaz eddig még egyetlen populációból sem írták le. A mutációk jelentős része (4/18, 22%) genomi aberráció (nagy deléció vagy duplikáció), ezekből 1 az MLH1 génben, 3 pedig az MSH2-ben volt kimutatható.

A betegség kialakulásával biztosan kapcsolatba hozható mutációkon kívül 7-féle besorolatlan variáns is találtunk (10 családnál, azaz a családok 17,5%-ában), ezek közül 2 (1 az MLH1-ben, 1 az MSH2-ben) előzetes vizsgálataink szerint erősen valószínűsíthetően patogén. A mutációk és a patogénnek tartott besorolatlan variánsok túlnyomó többségét a szigorú nemzetközi Amsterdam I–II klinikai kritériumoknak megfelelő családokban detektáltuk (>80%).

A fentiek alapján negatívnak talált családok további, kiterjesztett vizsgálata során 5 esetben fedtünk fel egy új hajlamosító genetikai eltérést, az MSH2 géntől 5' irányban elhelyezkedő TACSTD1 gént érintő deléciókat. Ezen esetek funkcionális karakterizálása során azt a hipotézist vetettük fel, hogy a TACSTD1 gén kifejeződése a deléciót hordozó esetekben hatással van az MSH2 expressziójára, így ezek a deléciók az MSH2 mutációival megegyezően a Lynch-szindrómához vezető hajlamosító tényezőknek tekinthetők. Javaslatot tettünk arra, hogy a fenti régió eltérései a rutin diagnosztikai vizsgálatok részét képezzék. Részlet a Human Mutation szerkesztőbizottságának véleményét ismertető főszerkesztői levélből: „The message of this manuscript is absolutely remarkable.”

Férfi emlőrákos minták vizsgálata

Kilenc férfi emlőrákos minta vizsgálatában 93 gén közül 7 mutatott szignifikáns ($p < 0,02$) eltérést a tumoros és egészséges szövetminták összehasonlításában: a daganatos szövetben egy génnél túlkifejeződést, míg hat gén esetében csökkent mRNS-expressziót határoztunk meg. Az érintett gének fehérjeszintű vizsgálatát tervezzük nagyobb betegcsoporton, immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával.

Molekuláris diagnosztikai szolgáltatások kifejlesztése (Dr. Szentirmay Zoltán – Országos Onkológiai Intézet; Dr. Soós Miklós – AuroScience Kft)

*Genetikai eltérések vizsgálata thymusdaganatokban
Lymphomák molekuláris diagnosztikája*

A pályázat időtartama során 1990–95 között előforduló, összesen 53, follicularis vagy centrocytás, centroblastos lymphomaként diagnosztizált esetet szövettantani és immunhisztokémiai szempontból újraértékelünk. Kidolgoztuk a vérben keringő és csontvelőben előforduló lymphomasejtek azonosítását, vizsgáltuk a lymphomák molekuláris stádiummeghatározását, a minimális reziduális betegséget, az immunoglobulin nehézlánc génátrendeződést és a BCL2-transzlokációt, végül kollaborációban az IgVH gének szekvenciáját és filogenetikai analízisét. 2008-ban e vizsgálatok összegzése történt meg és elkészült belőle Dr. Tóth Erika Ph.D. disszertációja.

*Gastrointestinalis stromalis tumorok (GIST)
molekuláris diagnosztikája*

A receptor-tirozinkináz KIT vagy PDGFRA gén konstitutív aktivációja alapvető szerepet játszik a GIST kialakulásában. Ezeknek a tumoroknak a molekuláris diagnosztikája két okból is feltétlenül indokolt: 1.) A KIT (CD117) nem specifikus immunhisztokémiai marker, gyenge pozitív reakció megfigyelhető egyéb mesenchymalis tumorokban, mint pl. desmoid tumor vagy leiomyosarcoma, ugyanakkor negatív a PDGFRA-mutáció esetén. 2.) A Gleevec-terápia hatékonysága illetve a daganatos betegség kimenetele nagymértékben függ a mutáció helyétől.

A mutációk leggyakrabban a KIT gén 11. exonjának 5'-végén fordulnak elő (70–75%), és az 550–560 codonokat érintik. Ez a terület a juxtamembrán domén és funkciója a KIT gén működésének negatív szabályozása. A mutációk felfüggesztik ezt a negatív szabályozó funkciót.

A KIT gén 11. exonjának mutációja nagyrészt in-frame deléció, de előfordul pontmutáció, vagy a 3'-vég internal-tandem duplikációja (ITD) is. A KIT gén 9. exonjának pontmutációja, illetve a PDGFRA gén mutációja sokkal ritkábban fordul elő. Az összes GIST-es beteg 10%-ában a fent említett két génben mutációt kimutatni nem lehet.

A KIT gén exon 11 deléciós mutációja agresszívabb biológiai viselkedéssel társul, ugyanakkor jól reagál Gleevec-kezelésre. A 9. exon mutációja, illetve az ITD sokkal indolensebb klinikai lefolyással társul.

2008-ban összesen 10 GIST molekuláris patológiai vizsgálatát végeztük el. A cKIT gén 9. és 11. exonjának valamint a PDGFRA gén 12., 14. és 18. exonjának PCR-amplifikációját végeztük el, és az így nyert DNS-mintát kapilláris-gélelektroforézis (Agilent) módszerrel illetve szekvenanciaanalízissel vizsgáltuk. A 10 tumorból 5-ben

a cKIT gén 11. exonjában deléciós mutációt azonosítottunk, egy-egy esetben a 9. és 11. exon és a PDGFRA gén 18. exonjának pontmutációja fordult elő, további két GIST-ben az említett két gén vizsgált régióiban mutációt kimutatni nem tudtunk.

A humán papillomavírus (HPV) kimutatásának jelentősége az anogenitális daganatok szűrésében és megelőzésében

A HPV magyarországi előfordulási gyakoriságát és genotípusait általunk kidolgozott hagyományos és valósídejű PCR módszerrel, illetve „Linear Array HPV Genotyping Test” (Roche) segítségével vizsgáltuk és összevetettük a cervixcitológiai képpel.

2008-ban (november 30-ig) a következő HPV-vizsgálatokat végeztük: cervix – 417 (sejtszuszpenzió + citológiai kenet); férfi partner – 26 (sejtszuszpenzió); fej-nyaki régió – 28 (friss műteti anyag vagy paraffinos blokk); egyéb régió – 8 (paraffinos blokk).

Méhnyak: Összesen 417 cervixcitológiai mintából 221 esetben tudtunk HPV-t kimutatni. Döntően 1 HPV-típus jellemezte a mintákat (164/417), míg a többes fertőzöttség sokkal ritkább volt (57/417). Ez utóbbi esetekben egy betegnél általában 2–4 HPV-féleség egyszerre fordult elő, de találtunk egy betegnél egy időben 7, egy másik betegnél 6 különböző törzset.

Fej-nyaki régió: 2008-ban összesen 30 szájüregi-, garat- és gégelaphámrák, vagy laphámpapilloma mintát vizsgáltunk, és 18 esetben tudtunk a tumorszövetben HPV DNS-t kimutatni (60%), ami jóval magasabb a korábbi saját adatainknál, de a kis mintaszámmal magyarázható. A laphámrákban a HPV 16 fordult elő leggyakrabban, de találtunk HPV 34, 53 és 76 típust is. A papillomákban (8 eset) a HPV 6 és 11 típus volt a gyakori, de találtunk HPV 96-ot és nem azonosított típusokat is.

Egyéb régiók: Összesen 4 perianalis condylomában, egy hüvelyccsonk- és egy vulvacarcinomában találtunk HPV 16 DNS-t.

Az EGFR és a KRAS gének mutációanalízise tüdő-adenocarcinomák szövetszövetmintáin

A tirozinkináz-inhibitor (TKI) terápiára reagáló betegek kiválasztásának optimalizálásához végezzük el tüdő-adenocarcinomák klinikai mintáin az EGFR és KRAS gének mutációanalízisét az általunk kidolgozott real-time PCR-t követő olvadáspont-analízisen alapuló módszerrel.

2007 októberéig 33 beteg anyagát vizsgáltuk és kezdeti eredményeink egyeztek az irodalmi adatokkal, mint erről a 2007. évi jelentésben részletesen beszámoltunk. Egy kissé kibővített beteganyagot végzett EGFR-mutációanalízis eredményeit és annak klinikai összefüggéseit a Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Szemlében tettük közzé 2008-ban. Ezen a 41 betegből

álló betegcsoporton is jól demonstrálható az EGFR-mutáció jelenlétének összefüggése a nemmel, dohányzási szokással és a szövetszöveti megjelenéssel.

Mivel Magyarországon TKI-terápiára előrehaladott tüdődaganatos betegek választhatók ki (III/B vagy IV stádium), és az ilyen esetekben a legkönnyebben elérhető vizsgálati anyag a kis biopsziás vagy citológiai minta, ezért célul tűztük ki, hogy kidolgozzuk az ilyen típusú mintákon elvégezhető mutációanalízist. Ennek lényeges eleme a megfelelő gépi DNS-izolálás, és kevés sejtet tartalmazó minta esetén teljesgenom-amplifikáció (whole genomic amplification) alkalmazása.

2008 novemberéig hozzávetőleg 300, primer vagy át-téti tüdő-adenocarcinoma mintát vizsgáltunk, részben az Országos Onkológiai Intézetben kezelt betegekből származó, részben az ország más kórházaiból beküldött mintákat. 244 feldolgozott eset alapján a KRAS-mutáció aránya hozzávetőleg 40%, míg az EGFR-mutációk 10% körüli gyakoriságúak. Lényeges, hogy kis számú esetben a fenti gének együttes mutációját detektáltuk az általunk alkalmazott módszerrel. Ez a jelenség az irodalomban kevésbé ismert, s ezért a klinikai jelentősége nem tisztázott, azaz nem ismert, hogy az ilyen úgynevezett kettős mutáns daganatok hogyan reagálnak TKI-terápiára. Bár a részletes hisztológiai elemzés még ezen a nagyszámú mintán nem teljes, előzetes eredményeink arra utalnak, hogy a KRAS-mutáns tumorok az ismert mucinosus fenotípuson túl rosszul differenciált megjelenést mutatnak.

Összegezve eddigi eredményeinket, kidolgoztunk egy, a klinikai gyakorlatban alkalmazható módszert az EGFR és a KRAS gének gyakori mutációinak detektálására, amely a klinikai és a hisztológiai paramétereket is figyelembe véve segít a beteg kezelő orvosnak a TKI-terápiára történő betegszelekció optimalizálásában.

A vastagbélrákok molekuláris diagnosztikája és prognosztikája

2008-ban további betegek tumorszövetmintáinak KRAS 2. exon 12. és 13. codon és a BRAF V600E mutációanalízisét végeztük el. A vizsgálatokat saját tervezésű PCR-primerek és -próbák segítségével valósídejű PCR és olvadáspont-analízis technikával végeztük. A PCR-próbákba ún. „Locked Nucleic Acid” (LNA) került beépítésre, és tisztán LNA-ból felépülő blockert is használtunk, ezáltal nemcsak az eljárás specificitása, hanem a szenzitivitása is megnőtt és elérte a KRAS-diagnosztikára kifejlesztett specifikus tesztek szenzitivitását. Az elért szenzitivitás azt jelenti, hogy a mintában előforduló 0,1%-nyi mutáns KRAS exon 2 DNS-szekvencia biztonsággal kimutatható volt 99,9%-ban jelenlévő normális szekvencia mellett. Az eredményeket DNS-szekvenciaanalízissel is ellenőriztük. Válogatás nélküli 202 tumorszövetmintában a KRAS-mutáció arányát 55%-nak találtuk, ami 69%-ban a 12. codont érintette. Érdekes összefüggés volt kimutatható a KRAS-mutáció előfordulási gyakorisága illetőleg típusa és a TNM-re

alapozott klinikai stádium között. A felfedezéskori előrehaladott stádiumú vastagbélrákok többsége hordozott KRAS-mutációt, ez az arány éppen fordított a korai stádiumban felfedezett tumoroknál. A 12. codon mutációi szintén előrehaladott tumorokban gyakoribbak, míg a 13. codon mutációi gyakrabban fordultak elő korai stádiumú daganatokban.

2. SZÁMÚ PROGRAMCSOMAG: DAGANATEREZŐDÉS DIAGNOSZTIKUS, PROGNOSZTIKUS JELENTŐSÉGE ÉS TERÁPIÁS KIAKNÁZÁSA (Dr. Tímár József – Országos Onkológiai Intézet)

*A daganat-ereződés sajátosságainak meghatározása
az egyes tüdőrák-altípusokban
(Dr. Döme Balázs – Országos Korányi TBC
és Pulmonológiai Intézet)*

*Keringő angioblasztok kimutatása különböző
típusú tüdőrákokban*

Bár a tüdőrákokban megfigyelhető endothelbimbózás ideális célpontja az érelenes terápiáknak, ma már tudjuk, hogy a tumorok kapillárisainak fejlődése nem csak e folyamat révén valósulhat meg. A szolid tumorok biztosíthatják vérellátásukat intusszuszeptív angiogenezissel, a gazdászövet kisereinek inkorporációjával, posztnatális vaszkulogenezissel, glomeruloid angiogenezissel vagy vaszkuláris mimikriával. A legfontosabb „nem bimbózas” mechanizmus nem-kissejtes tüdőrákban (NSCLC) az érinorporáció. A „nem angiogén” vagy „alveolaris típusú” növekedésnél tumorsejtek töltik ki az alveolusokat, ugyanakkor a daganatsejtek bekebelezik, de nem pusztítják el az alveolusok falát az inkorporált kapillárisokkal együtt. A tumorsejtfészkek alveolaris falal vannak körülvéve, nincs jelen neoangiogenezis (azaz endothelproliferáció vagy -bimbózás). A „nem angiogén” típusú NSCLC-k érhálózatának elemzése bebizonyította, hogy a vaszkulátúra a normális alveolaris kapillárisokéval megegyező, továbbá, hogy a „nem angiogén” és „angiogén” tumorok génexpressziója különböző.

Mivel az egyes NSCLC altípusokra nézve az irodalomban nem volt adat az érinorporáció jelenségének gyakoriságára vonatkozóan, vizsgálataink jelen szakaszában NSCLC-s betegek sebészileg eltávolított tumormintájának vaszkularizációs mintáját határoztuk meg immunhisztokémiai jelölés (CD31) segítségével. A vizsgált 54 adenocarcinoma és 35 laphámrák típusú tumor átlagos érdenzitása $65,7 \pm 25,1/\text{mm}^2$ és $69,11 \pm 24,6/\text{mm}^2$ volt, míg az átlagos érkerületek a fenti felosztás szerint $96,19 \pm 23,43$ illetve $97,08 \pm 16,64$ mikron voltak. Szignifikáns eltérést a fenti kapillárisparaméterekben a daganatokat az egyes NSCLC-alcsoportok szerint felosztva nem találtunk. Nem volt továbbá érdemi kü-

lönbség az egyes szövettani altípusok érinorporációs aktivitása között. Míg az adenocarcinomák 16,4%-a, addig a laphámrákok 18,2%-a volt a „nem angiogén” típusba sorolható.

Ugyanebben a betegcsoportban megvizsgáltuk a betegek túlélése és a kapillárisok kerülete illetve sűrűsége közti esetleges összefüggéseket is. Érdekes módon, bár a túlélés és az érkerületek között – szövettani altípustól függetlenül – szignifikáns összefüggést találtunk ($P=0,028$, Spearman-féle rangkorreláció), az érkerület mégsem bizonyult szignifikáns kockázati tényezőnek a túlélés vonatkozásában ($P=0,99$, $RR=1$; 95% CI 0,988–1,012, Cox-féle regressziós vizsgálat). Nem volt továbbá kimutatható szignifikáns kapcsolat az érdenzitások és a betegek túlélése között ($P=0,1$, Spearman-féle rangkorreláció; $P=0,32$, $RR=1,005$; 95% CI 0,995–1,015, Cox-féle regressziós vizsgálat). Mindez arra utal, hogy az alapvető érparaméterek tekintetében a kétféle szövettani típusú tüdőrák nem tér el egymástól, minthogy az érinorporációs fenotípus gyakoriságában sem.

*Innovatív molekulatervezés felhasználása új anti-angiogenetikus szerek kifejlesztésére
(Dr. Patthy László – MTA Enzimológiai Intézet)*

*Az új kis molekulatömegű ligandok in vitro tesztelése emberi endothelsejteken illetve angiogenezis-modelleken
(csirke chorioallantois membrán assay,
illetve daganatindukált angiogenezis)*

2008-ban az RGDS és az GRGESP integrinpeptidek angiogenezist befolyásoló képességét teszteltük. In vitro a HBE emberi véna-eredetű endothelsejteket és a KS emberi Kaposi-sarcoma sejteket használtuk, és proliferációs- illetve apoptózis-assay-eket végeztünk (48 óra). In vivo rendszerként a csirke chorioallantois membrán assay-t (CAM, 4 nap) illetve a HT25 emberi vastagbélráksejtek SCID egerben történő növekedésére gyakorolt hatást (daganatindukált angiogenezis; 26 napos teszt) mértük.

In vitro körülmények között az RGDS fiziológias integrinligand sem a HBE-, sem a KS-sejtekre nem gyakorolt szignifikáns hatást sem a proliferációs, sem az apoptózis-assay-kben. Ugyanakkor az GRGESP HIV-TAT-szerű peptid a HBE normális endothelsejteken (szemben a transzformált KS-sejtekkel) igen hatékonyan gátolta a proliferációt.

In vivo a CAM assay-ben, hasonlóan az in vitro tesztekhez, az RGDS peptid inaktívnak bizonyult, míg az GRGESP peptid >50%-os gátlást mutatott a 10–100 ng/ml dózistartományban.

Végül a xenograft-assayben (HT25 vastagbélrák) sc. kezeltük az állatokat 0,05 és 0,5 mg/kg/nap dózisban az oltást követő 2. héttől 14 napig. A tumortérfogat változása alapján az RGDS peptid ebben a tesztben sem bizonyult aktívnak, míg az GRGESP peptid dóziszfüggően gátolta a tumornövekedést, a maximális hatás a kísérlet végén 50%-os volt.

A fentiek alapján megállapítható, hogy az endothelsejtek integrinreceptorain keresztül befolyásolható a fiziológias és a patológiás angiogenezis is. Érdekes módon az integrinek konszenzus-ligandja, az RGDS nem rendelkezik ilyen hatással, azonban a HIV vírus TAT fehérjéjére hasonlító GRGESP peptid meglehetősen erős antiangiogenetikus hatással rendelkezik, és képes a daganatindukált angiogenezis folyamatát is befolyásolni.

Erythropoetin-indukált érelváltozások funkcionális jelentőségének elemzése daganatokban
(Dr. Tímár József – Országos Onkológiai Intézet,
Dr. Romány Anna – Janssen-Cilag Kft)

EPO-kezelés hatásainak klinikai kiértékelése. EPO hatása tüdőrák kemoterápiájára és célzott terápiájára (2008, új feladat)

Az anémia gyakran előforduló jelenség daganatos betegek esetében; csökkenti az életminőséget és a kezelés kedvezőtlen kimenetelét okozhatja. Számtalan különböző erythropoietikus hatóanyagot használnak a hemoglobinszint javítására, azonban ellentmondásos kísérleti és klinikai adatok állnak rendelkezésre a rekombináns humán erythropoietinek (rHuEPO-k) alkalmazásával kapcsolatban. Sugár-, vagy sugár- és kemoterápiában részesülő, különböző eredetű daganatos betegek rHuEPO-kezelése vegyes eredményeket adott a kezelés kimenetele szempontjából: az EPO anémiát korrigáló és életminőséget javító hatása nem kérdéses emlő-, fej-nyaki-, illetve méhnyakrákban szenvedő betegek esetében, azonban a teljes túlélés nem javult, bár a méhnyakrákra vonatkozó adatok újabb vizsgálatokat igényelnek. Ugyanakkor petefészek- és nyelőcsődaganatok rHuEPO-kezelésekor a teljes túlélésben javulás mutatkozott. Az ellentmondásos eredményeknek köszönhetően a legújabb áttekintő munkák arra a következtetésre jutottak, hogy a rHuEPO-kezelés hatása a daganatos betegek túlélésére legalábbis bizonytalan. Számos kísérleti és klinikai eredmény gyűlt össze a tumorsejtek EPO-receptor- (EPOR) expressziójáról, és az ezzel együtt járó fokozott daganatsejt-proliferációról, tumornövekedésről. Mindemellett jól ismert, hogy az anémia és különösen a tumorszövetek hypoxiája csökkenti a kemo- és sugárterápia hatékonyságát.

Napjainkban előfordulhat, hogy a NSCLC-s tüdőrákos betegeket már a korszerű antiangiogén kezelésben részesítik (Avastin), ugyanakkor a súlyos anémia miatt egyidejűleg EPO-szupportációban is részesülnek. Felmerült a kérdés, vajon a két kezelés milyen hatással van a daganatok érződésére, illetve az esetleges kemoterápiára. Ennek modellezésére a korábban megkezdett rHuEPO-hatásvizsgálatokat NSCLC-s xenograft modellekben kiegészítettük antiangiogén terápia kombinációival. Az ismert tény, hogy a VEGF-ellenes antitest (bevacizumab/Avastin) pozitívan befolyásolja különböző daganatok terápiáját. Azonban az antiangiogén

szerek alkalmazása során felmerül, hogy esetleg azok fokozzák a daganatos szövetek hypoxiáját, amelyet viszont rHuEPO-val csökkenteni lehet. Ezért kombinációs kezelésben megvizsgáltuk az EPO és a bevacizumab együttes hatását H1975 NSCLC xenograft modellben.

A véráramlást SPECT-CT-vel monitoroztuk a tumoros erekben in vivo. Azt tapasztaltuk, hogy az EPO-kezelés több mint kétszeresére növeli a perfúziót, míg a bevacizumab, és különösen a kombináció szignifikánsan csökkenti azt.

A kísérletek végén meghatároztuk a hypoxiás területek nagyságát az egyes csoportokban. Azt tapasztaltuk, hogy a kombinációs kezelés szignifikánsan csökkentette a hypoxiás terület nagyságát a gemcitabin-kezeléshez képest.

ZD6474 angioszuppresszív szer tesztelése előrehaladott NSCLC tüdőrákos betegeken

(Dr. Kovács Gábor – Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet, Dr. Heringh Alexandra – AstraZeneca Kft)

ZD6474-kezelés hatásainak feldolgozása, az angioblaszt-monitorozás értékének elemzése

A daganatok célzott kezelése közül a gyakorlatban jelenleg az ún. érelleses vagy „antiangiogén” kezelések (ezek közé tartozik a vizsgálandó ZD6474 is) a leghatékonyabbak közé tartoznak. Az infúzióban adható érelleses gyógyszerek egyrészt gátolják az új daganatos erek kialakulását (lassítva vagy megállítva ezzel a daganat növekedését), másrészt javítják az egyidejűleg alkalmazott kemo- és/vagy sugárterápia hatékonyságát.

A daganatok növekedésének elengedhetetlen feltétele a megfelelő érhálózat kialakítása, melyet a daganatsejtek a szöveti oxigénhiány hatására felszabaduló érképző molekulák termelése révén indítanak meg. E molekulák hatására a daganat környezetében elhelyezkedő kiserek növekedésének megindulása mellett a csontvelőből endotheliális őssejtek (endothelial progenitor cells, EPCs) kerülnek a vérkeringésbe, jutnak el a daganatot tápláló érhálózatba és épülnek be azok falába, támogatva az erek további növekedését. A daganatokat tápláló érhálózatot tehát a daganatsejtek által termelt érképző vegyületek hatására újonnan képződött erek építik föl, melyeknek építőkövei az úgynevezett endothelsejtek és az EPC-k.

A keringő VEGFR2+ EPC-szám változásait határoztuk meg kezeletlen és ZD6474-kezelt nem kissejtes tüdőrákos (NSCLC) betegeken. Vizsgáltuk továbbá a VEGFR3+ LVEPC-k (lymphatic vascular endothelial progenitor cells) kissejtes (SCLC) betegeken és egészséges kontrollok személyekben mérhető számát.

Metodikai fejlesztés: A keringő EPC-k számának meghatározásához a vörösvértestlízist követően fennmaradt perifériás vér mononukleáris sejtfrakciót használtuk. Ezt reszuszpendáltuk 90 µl PBS-ben és 0,1%

bovin albuminban, majd inkubáltuk 30 percet 4°C-on PE-Cy5-konjugált anti-humán CD34 (BD Biosciences, San Jose, CA) és APC-konjugált anti-humán VEGFR2/VEGFR3 (R&D Systems, Minneapolis, MN) vagy PE-konjugált anti-humán CD133 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország) és APC-konjugált anti-humán VEGFR2/VEGFR3 antitest kombinációkkal. Megfelelő fluorochrommal konjugált izotípuskontrollokat használtunk minden egyes jelölés esetén, majd meghatároztuk a CD34+/VEGFR2+ és a CD133+/VEGFR2+ illetve a CD34+/VEGFR3+ és a CD133+/VEGFR3+ kettős pozitív sejtek számát (db/perifériás vér ml). A vizsgálatokhoz a CyFlow SL áramlási citométert és a FlowMax szoftvert használtuk (Partec, Münster, Németország).

Eredmények: Vizsgálataink jelen fázisában elvégeztük a tüdőrákos betegek perifériás vérmintái EPC- és LVEPC-számának flow cytometriás meghatározását. NSCLC-s betegek esetében a ZD6474-kezelt és kezeletlen betegek perifériás vérében mérhető EPC-számokban nem volt szignifikáns különbség ($P > 0,05$, $n=8$). Szignifikánsan emelkedett LVEPC-számokat találtunk ugyanakkor az SCLC csoportban az egészséges kontrollokhoz képest. Megállapítottuk továbbá, hogy az SCLC-s betegek perifériás vérében mérhető LVEPC-szám szignifikánsan összefügg a nyirokcsomó-érintettséggel, illetve a betegek túlélésével. Ezen adatok arra utalnak, hogy a nyirokendothel-prekurzorok szintjének prognosztikus jelentősége lehet kissejtes tüdőrákban. A keringő EPC-k meghatározásának tüdőrákban prognosztikus és prediktív értéke is lehet, ahogy azt már néhány hasonló vizsgálat sugallta. Saját eredményeink az elsők között vannak ezen a területen.

3. SZÁMÚ PROGRAMCSOMAG: ÚJ MELANOMA-DIAGNOSZTIKUMOK ÉS TERÁPIÁS ELJÁRÁSOK FEJLESZTÉSE (Dr. Tímár József – Országos Onkológiai Intézet)

*Melanoma-marker azonosítása globális genomika segítségével
(Dr. Tímár József – Országos Onkológiai Intézet)*

*Új melanoma-markerek proteínexpressziójának vizsgálata
immunhisztokémiával naevusban és melanomában*

EGFR epitóp-mapping

Saját korábbi munkánk kimutatta, hogy bár az EGFR-expresszió emberi melanomában ún. konstitutív, azonban ennek hátterében sokféle ok állhat, ahogy azt magyar szerzők kimutatták (Ránki, Szentirmay, Balázs, Int J Cancer 2007), mint amilyen az EGFR-amplifikáció bizonyos típusú bőrmelanomában (noduláris forma). Ugyanakkor saját genetikai vizsgálataink arra utaltak, hogy hasonlóan az agy glioblastomájához, bőrmelanomában 50%-os gyakorisággal ún. extracelluláris domén-de-

léciók fordulnak elő. Ennek az egyik következménye a gén konstitutív aktivációja, ahogy azt a 2007-es jelentésünkben igazoltuk. Ugyanakkor ez a genetikai hiba a gén fehérjetermékének kimutatását igen megnehezíti. A forgalomban lévő és FDA-engedélyezett EGFR diagnosztikus kitek (Dako PharmDX és Ventana Confirm) az extracelluláris domén juxtamembrán szakaszára specifikusak, így humán melanoma esetében kérdéses a használhatóságuk. Ezért paraffinos melanoma-mintáinkon végigteszteltük a kereskedelmi forgalomban lévő anti-EGFR antitesteket, amihez pozitív kontrollként fej-nyaki laphámrákot és tüdőadenocarcinomákat használtunk.

Alapvető feltétel volt, hogy az antitest paraffinos mintákon működjön formalinfixálás esetében. E feltételnek nem sok antitest felelt meg. Az ún. ligandkötő doménnel, mely a jelenleg forgalomban lévő anti-EGFR ellenanyag-terápiák szempontjából a kritikus domén, egy antitest reagál, a Labvision AB10. Nagyon kevés olyan antitest van forgalomban, amely extracelluláris domén-hiányos, ún. csonkolt EGFR-t is ki tud mutatni. Erre kétféle megoldás létezik, az egyik a foszforilált antitestek használata, melyek a citoplazmatikus domén ún. autofoszforilációs szakaszát ismerik fel, erre a Zymed Y1086 és a Epitomics Y1173 antitestjei alkalmasak. Másik lehetőség az ún. C-terminális szakasz kimutatása, melyre alkalmas anti-peptid antitestet a Biogenex cég forgalmaz. A háromféle ellenanyag-típus kombinálásával az adott melanomában expresszálandó EGFR fehérje domén-mintázata nagy pontossággal megjósolható, sőt a gén esetleges konstitutív aktiváltságát is meg lehet alapítani.

Fenti EGFR immunhisztokémiai protokollunk nemcsak a melanoma, hanem az EGFR-terápiában érintett más szolid daganatok molekuláris diagnosztikájában is hasznosítható (tüdőrák, vastagbélrák illetve fej-nyaki laphámrák).

*CD44 splicing mintázat melanoma-marker
jellegének igazolása*

A CD44 egy sejt felszíni glikoprotein. A proteint kódoló gén a 11-es kromoszóma rövid karjának 13-as lókuszában helyezkedik el, és 9 standard, valamint a variábilis régiót kialakító 10 variábilis (v1–10) exonjával több tízezer potenciális, eltérő szerkezetű fehérjeizomorfát kódol, melyek funkciója további poszttranszlációs modifikációk – többnyire glikáció – során még tovább változhat, kialakítva a gén extracelluláris mátrix (ECM) kötésétől a sejtnövekedés és sejtmigráció szignálutaiban való részvételig terjedő igen eltérő funkcióit. A gén alternatív splice mintázatának (ASM) szövetspecifitását már 1997-ben leírták egészséges szövetekben, ám a mai napig nem készült olyan tanulmány, mely különböző tumortípusok CD44-mintázatát vizsgálná. Az irodalomban leginkább egy-egy variábilis exon tumorprogresszióban betöltött szerepét vizsgálják, figyelmen kívül hagyva, hogy az

adott variábilis exon mindig egy komplex ASM része, és azt, hogy *in vivo* nem az egyes exonok töltik be a molekula funkcióját, hanem a kiérett, alternatív splice révén létrejött izoforma. Talán ennek köszönhető, hogy ellentmondásos közlemények jelennek meg a CD44 variábilis exonjainak funkciójáról.

Munkánk során különböző humán tumorok CD44-expressziós mintázatát vizsgáltuk annak eldöntésére, hogy létezik-e az egészséges szövetekhez hasonlóan tumorspecifikus alternatív splice mintázat. Öt primerpárral végzett PCR-sorozatunk az egész variábilis régiót lefedte öt átfedő szekvenciával, lehetővé téve különböző egy időben, párhuzamosan expresszálandó izoformák azonosítását a kvalitatív képből. A PCR-termékeket mindig azonos sorrendben megfuttatva létrejön egy virtuális, vonalkód-jellegű mintázat, az ún. 'CD44-ujjlenyomat', amit a CD44 ASM egyszerűsített leképezésére használhatunk.

A vizsgált panelben első lépésben *in vitro* növo, hisztológiailag eltérő humán tumorok szerepeltek: tüdőtumorkok (H358, H1975, H1650), prostatacarcinoma (DU145), colorectalis carcinomák (HT29, HT25, HCR31, HCT116), sarcomák (Kaposi, HT1080) és melanomák (HT168-M1, WM35, WM983A, A2058, HT199, WM983B, M35/01). Az összes általunk vizsgált minta ujjlenyomatát összehasonlítva bebizonyosodott, hogy nemcsak szövettanilag azonos tumorok mintázata azonos, tehát tumortípusra specifikus, hanem különbözik más tumortípus mintázatától. Jóllehet a variábilis exonok méretbeli hasonlóságából adódóan néhány izoforma egy band-nek látszik a kvalitatív képből, az öt PCR-termékből alkotott (CD44 ASM-át reprezentáló) ujjlenyomat elég információt hordoz a tumorok azonosításához.

A következő lépésben humán szöveti mintákból lézer-mikrodisszekcióval (LMD) izolált tumoros szöveteken igazoltuk, hogy a mintázat *in vivo* teljes mértékben azonos az *in vitro* mintákéval (a szöveti környezet „szennyezése” viszont lényegesen torzíthatja azt).

Eredményeink tehát azt mutatják, hogy létezik az egyes humán tumorokra jellegzetes CD44 ASM, amely könnyen láthatóvá válik az általunk alkalmazott ujjlenyomat detektálásával, így potenciálisan jól használható eszközként szolgálhat a molekuláris patológiai diagnosztikában és differenciáldiagnosztikában. Kísérletes modelljeink azt is igazolták, hogy ez a tumorspecifikus mintázat adott tumor áttétében kvalitatívan megtartott, így ez a módszer (további humán validálást követően) okkult tumorok felkutatására is használható.

Munkacsoportunk továbbá leírta a v2, v3 és v6 variábilis exonok expressziós szintjének változásait a tumorprogresszió során, igazolva, hogy azt esetenként drámai változások jellemzik. Felmerül a kérdés, hogy az áttétképzés és az expressziós szintek változása milyen ok-okozati összefüggésbe hozható egymással. Vajon az emelkedett mennyiségű CD44-izoformákat hordozó tumorsejtek válnak áttétképzővé és az utód-

sejtpopuláció megtartja ezt az emelkedett szintet? Esetleg az áttéti lokalizáció felelős az új expressziós szint kialakulásáért? *In vivo* kísérleteink azt igazolták, hogy ugyanazon tumorsejtpopulációból (szemi)ortotopikus oltást követően létrejött tüdőáttétek ill. iv. oltást követően létrejövő kolóniák kvalitatív CD44-ujjlenyomata azonos, de lényeges kvantitatív eltérések mérhetők (qPCR-ral) az egyes variábilis exonok vonatkozásában. Azaz, minden jel szerint bizonyos CD44-izoformák fokozott expressziója egyértelműen összefüggésbe hozható, pontosabban (bár valószínűleg sok egyéb faktortól párhuzamosan) felelőssé tehető az áttétképzés létrejöttéért. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a metasztatizáló klón nem a variábilis exonok arányváltozásainak következtében alakul ki, hanem már eleve léteznek megváltozott arányokkal rendelkező sejtek a primer tumor sejteje között, és ez egyike lehet azoknak a faktoroknak, mely a metasztatikus klón kialakulásához vezetnek.

*Új melanoma-antigének géntechnológiai azonosítása
(2008, új feladat)*

A malignus sejtek antigénstruktúrája megváltozik, amit az immunrendszer felismerhet, s ez szerepet játszhat a tumorsejt elleni küzdelemben. Új felszíni antigének kimutatására irányulnak azon vizsgálataink, amelyek alapja egy korábbi közleményünk (Kotlan et al. Hum Antibodies 2003). A különböző forrásból származó immunglobulin (Ig) molekulák és T-sejt-receptor (TcR) láncok molekuláris genetikai elemzése és szintézisének mechanizmusa különösen komplex. Több lókuszon belüli DNS-átrendeződés, nukleotiddeleciók és -inszerciók az átrendeződési kapocs (N-diverzitás) régióban és szomatikus hipermutációk, csak néhány azon biológiai mechanizmusok közül, amelyek az óriási potenciális immunoglobulin- és T-sejt-receptor glikoprotein-diverzitást eredményezik. Ennek figyelembevételével belátható, hogy a tumorasszociált antigénnel szemben reagáló ellenanyagok kiválasztása tumoros betegek perifériás vér-, nyirokcsomó- vagy egyéb forrásból szeparált limfocitáinak felhasználásával, igen bonyolult feladat.

A munka egyrészt a hozzáférhető adatbázisok (EMBL, GenBank, DDBJ, BLASTn, IMGT) és különböző nukleinsav-elemző szoftverek (BioEdit, TreeView, Vector NTI) felhasználásával végzett összehasonlító DNS-szekvenciaanalízisből állt. Ehhez ismert antigénspecificitással rendelkező antigénkötésért felelős Ig variábilis génrégiók jellegzetes tulajdonságait elemeztük a nemzetközi ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://imgt.cines.fr>) magas kvalitású integrált információs rendszerrel, amely kimondottan a humán (és más gerinces) immunglobulin, T-sejt-receptor és fő hisztokompatibilitási antigénkomplex molekulákra specializált. A standardizált nukleotid- és proteinszekvenciákat, oligonukleotid primereket, géntérképeket, genetikai polimorfizmusokat, 2D és 3D szer-

kezeteket alapul véve volt lehetőség a kiterjedt összehasonlító analízisre, amely révén a kérdéses Ig variábilis nehéz- és könnyűlánc-tulajdonságok feltérképezhetőek. Az IMGT/V-QUEST, IMGT/JunctionAnalysis, IMGT/Allele-Align, IMGT/PhyloGene interactive-ot használtuk.

Eredmény: TreeView analízis homológiafok alapján való DNS-szekvenciaeltérés mértékének meghatározása Fitch-Margoliash 3.6a2.1 statisztikai számítással megtörtént. Ennek révén sikerült három kiemelt specificitású Ig variábilis nehézláncrégió-csoportot definiálni.

A munka másik részét azon módszertani metodika beállítása képezte, ami lehetővé teszi a specifikus antigénkötés kimutatását különböző biokémiai összetételű tumorsejtfelszíni struktúrák esetében. Ez a feladat azért kiemelkedően fontos, mert különböző immunhisztokémiai eljárások során alkalmazott technológiák sok esetben módosítják a sejtfelszíni antigéntulajdonságokat, ami meggátolja a specifikus kimutathatóságot. A natív antigenitást legjobban megőrző egyik módszer a sejtkultúraelemzés („chamber slide”) használatával valamint a kriosztátos metszeteken végzett immunfluoreszcens teszt és konfokális mikroszkópos értékelés. Mivel különleges biokémiai tulajdonságú sejtfelszíni struktúra kimutatása a cél, döntő jelentőségű az antigén epitóp és biokémiai sajátosságait megőrző megfelelő metodikai eljárás beállítása. Az egyes tumorasszociált antigének sejtfelszíni expressziójának mértéke változó, és különböző szolid tumorok vonatkozásában is eltérést mutat, ezért a különböző fixálási, jelölési és mosási lépések optimális beállítása volt a célunk. A melanoma-szövetminták elemzésre igen alkalmasak, mivel a kérdéses glikoprotein-alapú markerek és ceramidvázas tumorasszociált antigének viszonylag nagy mennyiségben fejeződnek ki. Az általános cél a malignus kóros és normális szövetek differenciált diagnózisa, tehát olyan eljárás kell, amely révén a tárolt, fixált és paraffinba ágyazott metszetek esetében is kimutathatóak olyan speciálisabb biokémiájú ceramidstruktúrájú antigének, amelyek nagy szerepet játszanak a tumorsejtek osztódásában.

Eredmény: A sejtkultúraelemzésen és kriosztátos metszeteken végzett vizsgálatok, valamint a változtatott metodikai beállításokkal végzett kísérlet-sorozat eredményeként nyert immunhisztokémiai tapasztalataink és a tesztelendő antitest-preparátumokkal kapott immunfluoreszcens minták pozitív kontrollként alkalmazhatók a speciális biokémiájú, érzékeny struktúrák immunhisztokémiai detektálására paraffinos metszeteken is. A módszerbeállításnál eddig felülűző jellegű, kis ellenanyag-koncentrációjú preparátumok álltak rendelkezésre, ezért halványan pozitív csak a reakciómintázat. A tisztítási folyamatot követően nyert koncentrált ellenanyagmintákkal lényegesen erősebb lesz a specifikus jelölődés.

Melanoma áttétképzési képességét meghatározó genetikai konstellációk meghatározása

A vizsgálatok eredményeként egy ún. melanoma-progressziós PCR-kit illetve immunhisztokémiai kit prototípusának kialakítása

Metasztázis-prognosztikus mintázat (primer tumor) meghatározása

Szemben számos emberi daganatféleséggel (emlőrák vagy tüdőrák), a bőr melanómája esetében az elmúlt 10 évben folytatott kutatások nem vezettek klinikailag használható eredményre, nem születtek olyan génextpressziós mintázatok, amelyek meghatározásával a primer tumor eltávolításakor a klasszikus klinikopatológiai prognosztikus tényezőknél hatékonyabban lehetne a betegség tényleges kimenetelét megadni. A vizsgálatok ún. meta-analízise azt mutatta, hogy ennek alapvetően kétféle oka van: a technológiai platformok igen gyenge szereplése, másrészt a vizsgálathoz felhasznált klinikai minták hibás szelekciója illetve inkorrekt beválogatása. Gyakorlatilag egyik korábbi vizsgálat sem ügyelt arra, hogy a bőr melanómája szövettanilag heterogén (legalább 3 nagy alcsoportja van eltérő genetikával), nem ügyeltek arra, hogy prognosztikus mintázatot a primer tumor vizsgálatával érdemes meghatározni (mindösszesen 2 ilyen vizsgálat volt, a többi esetében vagy bőrátéteket, vagy regionális nyirokcsomóátéteket vizsgáltak, melyek mintázata sokkal inkább leszűkíti a szükséges gének körét). Míg a primer tumorban a metastázis-kezdeményező és a metastázis-fenntartó gének mind megtalálhatók, addig ha átéteket vizsgálnak, abból a metastázis-kezdeményező gének már hiányoznak. A nemzetközi adatbankokban (elsősorban a GEO adatbázisban) fellelhető microarray-alapadatokat ezért újraanalizáltuk. Csak olyan vizsgálatot elemeztünk, melyben klinikai mintát vizsgáltak, ezzel is el kívántuk kerülni a sejtvonal-specifikus mintázatok torzító hatásait. A próbákat az Affymetrix NetAffx központ segítségével „közös nevezőre” hoztuk (Affymetrix ID). Az adatokat MAS5.0 módszerrel normalizáltuk az R statisztikus környezetben. A prognosztikus génmintázatot a PAM módszerrel definiáltuk (prediction analysis for Microarrays), amit a „leave one out” módszerrel teszteltünk tovább. A 2006-os elemzéseink révén a saját klinikai anyagunkon validált 29 génes prognosztikus mintázatunkat is együtt elemeztük a nemzetközi adatokkal. Ebben a vizsgálatban egy kicsiny, 5-génes ún. prognosztikus mintázatot találtunk, melyben 3 új génnel mellett (ADAMTS8, DAPK3, IL13R1) a korábban már megfigyelt 2 gén, az FZD9 és az IGFBP7 szerepeltek. Jellemző módon, a saját adatbázisunk alkalmazása nélkül a korábban publikált 4 vizsgálatban közölt mintázatok mindösszesen 2 közös prognosztikus gént tartalmaztak: az MCM3-at és az NFKBIB-t.

Hasonló módon elvégeztük a metastázis-fenntartó gének tekintetében is a nemzetközi vizsgálatok meta-analízisét a fenti módszerekkel. Itt is 4 vizsgálat alap-

adatai voltak elérhetőek, melyek többsége kevert minta volt (bőrattét és nyirokcsomóattét vegyesen), csak 1 olyan vizsgálat létezik, amelyben tisztán bőrattéteket elemeztek. Egy további vizsgálatban szervi attétekből származó minták szerepeltek, amely tehát a szervi attéteket fenntartó mintázat meghatározását teheti lehetővé. Ennek az 5 adatbázisnak az elemzésekor az igazolódott, hogy a szervi attét mintázata alapvetően eltér az összes többitől, ami nem nagy meglepetés. A többi vizsgálat közös nevezője a nagy valószínűséggel bőrattét-specifikus mintázat: AQP3, LGALS7 SFN. A nagy heterogenitás és igen csekély átfedés háttérében számos tényező állhat, mint azt fentebb már elemeztük, így azt gondoltuk, hogy megfelelő humán melanoma kísérleti modellrendszerben ismételtelen elemezzük a genomikai mintázat folyamatos változását a tumorprogresszió egyes kiindulási lépéseiben, amitől azt vártuk, hogy ezzel pontosabb képet kapunk az érintett génekről és így egyértelműbben körülhatárolhatjuk a diagnosztikában számításba jöhető gének körét.

*Metasztázis-fenntartó génmintázat meghatározásának
preklinikai elemzése*

A daganatok áttétképzésével összefüggésbe hozható génextpressziós változások meghatározásánál több elméleti problémával kell szembenéznünk. Jóllehet technikailag igen impozáns vizsgálórendszerek állnak rendelkezésünkre, amelyek akár a teljes humán genom kvalitatív és kvantitatív „átfésülését” is lehetővé teszik, hibás kérdésfeltevéssel használhatatlan, hamis eredmények hasonló nagyságrendű mennyiségét is generálhatjuk. Egy sejt génextpressziós mintázata finoman szabályozott, összetett folyamatok eredménye kvalitatív és kvantitatív szinten egyaránt. Jóllehet a differenciálódás által megszabott expressziós panel egyértelműen meghatároz egy, az adott sejt típusra jellemző, funkcióinak ellátására az evolúció során elég precízen „beállt” és optimalizált RNS-pool ujjlenyomatot, a normális és kóros közötti különbség meghatározása adott esetben mégis komoly problémát okozhat. Már egyetlen sejt izolált vizsgálatánál figyelembe kell vennünk az interindividuális különbségeket. Valószínűleg nincs két olyan egyed (újabb kutatások szerint még az egyetűjű ikreket is beleértve), amelyek genetikai anyaga és annak megfelelően adott sejtjének génextpressziós mintázata megegyezne egymással. Amint ezt a sejtet szöveti környezetbe helyezzük, és az kommunikálni kezd a környezetével, ez a mintázat a környezeti hatásoknak megfelelően, de attól mindenképpen függően változni fog. Azaz a host genetikai különbségére annak fiziológiás állapotával (életkor, táplálkozás, környezet, fiziológiás ciklusok stb.) és működésével összefüggésbe hozható expressziós eltérések fognak „rarakódni”. Ha igen finom vizsgálómódszereket használunk – pl. egy génextpressziós DNS-chipet – már itt óriási problémát jelenthet(ne) annak eldöntése, hogy két egyed

közül melyik génextpressziós mintázata a „normális”. Ha biztosak vagyunk abban, hogy fiziológiásan teljesen ép egyedeket hasonlítunk össze, megfelelően nagy számú egyed bevonásával statisztikailag meghatározható egy „normal range”, amelyen belül ez a mintázat „egészségesnek” vagy „normálisnak” fogadható el. A helyzet lényegesen bonyolódik, mikor daganatok kiértékelésére kerül sor a fentivel azonos platformon. Adott daganattípus karcinogenezisében több, gyakran nem is azonosított folyamat játszhat szerepet. Ezt az első „elrontott sejtet” ráadásul nem is érhetjük tetten, mivel a daganatoknál oly jól ismert genetikai instabilitás igen gyorsan számos járulékos elváltozással/mutációval gazdagítja a képet. És most, ha belegondolunk, a host adta genetikai változatosság, a karcinogenezis és az arra ráarakódott járulékos mutációk okozta változásokhoz újra hozzá kell adnunk egyéb interindividuális különbségeket is, mint amilyen a daganat lokalizációja, a beteg életkora, fiziológiás státusza, a mintavételezés helye (hypoxiás esetleg nekrotikus terület) és ideje (kezdeti vagy előrehaladott stádium), az esetleges megelőző kezelések és a tumor környezetéből származó szövetek „szennyező” vagy maszkoló hatása. Amennyiben prognosztikus/diagnosztikus faktorok után kutatunk, megint megpróbálhatjuk segítségül hívni a nagy számok törvényét, azaz statisztikus módszerekkel megfelelően nagyszámú, komplex, működő rendszerből (szövetből) származó mintából eredmények kiértékelését követően következtetéseket levonni. Azonban mint a fenti felsorolásból is kitűnik, ebben az esetben annyi változóval vagy szabadsági fokkal dolgozunk, hogy a magáért a progresszióért felelőssé tehető, azzal okozati összefüggésbe hozható elváltozások elvesznek ebben az információtömegben, esetleg eltörpülnek az általuk elindított másod-, harmad- vagy többedleges folyamatok tengerében. Gyakran nehezíti a feladatot a nem megfelelő mintakezelés, amely nem feltétlenül szakmai inkompetenciából származik. Legtöbbször komoly technikai problémát jelent a minták oly módon történő kezelése, amely az igen könnyen lebomló RNS-eket a funkcionális állapotnak megfelelő mennyiségben (up- vagy down-regulált expresszióval ez döntő lehet) ill. arányban (hisz közismert, hogy mennyire eltérő különböző mRNS-ek bomlási ideje) őrzi meg. További bonyodalmat okoz, hogy szinte kizárt, hogy ugyanazon betegből egyidejűleg primer és áttéti tumorhoz jussunk, különösen nem melanomák esetén, ahol elég ritkán kerül sor attétek eltávolítására. Fontos azonban hangsúlyoznunk, hogy az áttétképzést jellemző expressziós mintázat értelmezésére és használatára csak akkor van mód és lehetőség (és reményeink szerint csak ebben az esetben kapunk következetesen ismétlődő változásokat), ha annak háttérében genetikusan (egy overexpresszió esetén pl. amplifikáció, vagy adott gén promotereinek mutációja, koaktivátorok/korepresszorok változása) vagy epigenetikusan (pl. metilációs pattern) rögzült változások vannak, ellentétben a mintázat temporálisan hullámzó funkcionális változásaival.

Mindezek tükrében érthetően felmerül az igény egy jól kezelhető, a lehetőségek határáig leegyszerűsített modell létrehozására. A veleszületett immundeficiens SCID egerekben növo human melanomák megfelelő modellnek ígérkeztek. Ebben a rendszerben az elmúlt években módunk nyílt arra, hogy több in vitro fenntartott human melanoma-sejtvonal in vivo viselkedését tanulmányozzuk az áttétképzés során. Kísérleteink kiindulópontja az a megfigyelés volt, hogy szemiototopikus (szubkután) implantációt követően a human melanomák újszülött állatban mindig áttétet képeznek, míg felnőtt állatban soha. Azaz genetikailag azonos eloszlású sejtpopulációt (daganatok esetén a genetikai instabilitást figyelembe véve csak erre vállalhatunk garanciát) egymástól csak fiziológiás státuszában eltérő (újszülött/felnőtt), de genetikailag az elérhető legnagyobb azonosságot mutató (az inbred SCID egerek egy petyéjű ikreknek tekinthetők) hostba implantáltunk azonos időpontban, ugyanazon sejtuszuspenzióból, ugyanazon lokalizációba. A tumor eltávolítása ugyanabban az időpontban történt oly módon, hogy a mintákat az eltávolítást követően azonnal -70°C -ra fagyasztottuk. E vizsgálataink során három, genetikailag eltérő melanomavonal viselkedését hasonlítottuk össze ebben a rendszerben és azt vizsgáltuk, melyek azok a gének, amelyek legalább két vonal esetén azonos irányú (up vagy down) szignifikáns eltérést mutatnak a metasztatikus fenotípusú (újszülött állatokban növo) primer tumorokban a nem metasztatikus (felnőtt állatokban kifejlődött) primer tumorokhoz viszonyítva.

Ezekben a kísérletekben a vizsgált primer tumorok közvetlenül a hostból származtak. DNS-chipjeink specifikussága így elvben arra is lehetőséget nyújtott, hogy azonos mRNS-poolból külön vizsgáljuk a progresszióban szerepet játszó tumor (human chip) és a host (egér chip) eredetű faktorokat. Modellünket arra a korábbi eredményünkre alapoztuk, hogy az újszülött állatban a host-eredetű szelekciós nyomásra egészen más expressziós mintázattal jellemezhető, feltehetőleg lényegesen több áttétképzésre alkalmas sejtet tartalmazó populáció nő ki, mint a kifejlett állatokban. Az ily módon kiszűrt, potenciálisan áttétképzéssel asszociálható gének listáját (visszaellenőrzés után) összeállítottuk.

Nyitott kérdés maradt azonban, hogy ez a mintázat ténylegesen metasztázis-asszociált géneket tartalmaz, amelyek ok-okozati összefüggésbe hozhatók az áttétképzéssel, vagy olyan host-tumor kölcsönhatásból származó mintázatot, amely a tumorsejtek valamennyi „válaszát” tartalmazza az adott hostban és lokalizációban megjelenő hatásokra (amely persze szintén nagyon informatív lehet, sőt akár maga a megoldás is!). Ez a mikrokörnyezettel való kommunikáció rendkívül fontos, ha belegondolunk abba a ténybe, hogy a többlépcsős áttétképzési folyamat során hányféle környezet hatásaival kell kooperálni a tumorsejtnek a túléléshez. Mindenképpen meghatározó a keringéshez való alkalmazkodás és az áttétképzés helye mikrokörnyezetének, az ott fellépő hatásoknak nemcsak a tolerálása, de teljes felhasználása, hisz a sejtől akkor lesz áttét, ha komplett kolóniát

képes létrehozni ('seed and soil' hipotézis). A következő modellünkkel megpróbáltuk kiszűrni az áttétképzéshez szükséges és talán elégséges génexpressziós változásokat. A kísérleti felállás a következő volt: újszülött és felnőtt SCID egerekbe szubkután HT199 melanomát implantáltunk. Ugyanezen sejtuszuspenzióból kifejlett állatokba intravénásan is injektáltunk sejteket. Az implantációtól számított 30. napon az állatokat alattásban elvéreztettük. Primer in vitro tenyészeteket hoztunk létre ugyanazon (újszülöttként implantált) állat primer tumorából, a keringésből származó tumorsejtől és a tüdőáttétből. Ugyanígy a felnőtt állat szubkután tumorából, keringésből származó tumorsejtől és a felnőtt állat tüdejében iv. oltással létrehozott kolóniákból. Ezzel a sejteket mintegy „fehér háttérre” ültettük, azaz kiszűrtük a speciális környezettel (bőr, keringésben úszás, tüdő) való kommunikáció „zaját”. A tenyészetekből teljes RNS-t izoláltunk. Az expressziós mintázatot két megközelítésben vizsgáltuk: tematikus és szisztematikus módon. A tematikus vizsgálat alapja az apoptózis/sejtciklus és az oxidatív stressszel asszociált kulcsfontosságú gének qPCR-alapú kvantitatív meghatározása volt. Összesen 114 gén expressziójának kvantitatív meghatározását végeztük el BioTrove OpenArray™ nanochipeken 3-3 párhuzamos méréssel a fenti mintákon. Metasztázis-asszociált géneknek tekintettük azokat a géneket, amelyek újszülött állat primer tumorához képest egyirányú szignifikáns változást (min. 2x up vagy 0,5x down) mutattak az áttéti tumorban és a keringésből izolált tumorban egyszerre és emellett még azonos irányú szignifikáns változást legalább egyikében a felnőtt primer tumor vs. kolónia és/vagy felnőtt primer tumor vs. a felnőtt állat keringésből izolált tumorában.

Ugyanezen RNS-mintákat elemeztük a 14 833 génspecifikus próbát tartalmazó Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) DNS-microarray segítségével. Valamennyi mintát külön hibridizáltuk, így tetszőleges összehasonlításra nyílt lehetőségünk. Munkahipotézisünk szerint (amely a válogatás alapját képezte) azok a gének tekinthetők áttétképzés-asszociáltak, amelyek egyszerre, egyirányban és szignifikánsan változnak az újszülött primer tumorához képest annak keringésből izolált tumorsejt-utódpopulációjában, újszülött primer tumorához képest annak tüdőáttétéből származó tenyészteti sejtekben, felnőtt állat primer tumorához képest annak keringésből izolált tumorsejt-utódpopulációjában és a felnőtt állatból izolált kolóniából tenyésztett sejtekben. Hipotézisünk szerint ezek azok az expresszióbeli eltérések, amelyek felelősek lehetnek a keringésben ill. a tüdőben mint új környezetben való túlélésért.

Összesen 94 ilyen gént választottunk ki, amelyek qPCR-al történő validálása folyamatban van. Tényleges igazolást áttétképzésben való szerepük azonban csak akkor nyerhet, ha valamilyen funkcionális gátlás (pl. géncsendesítés) vagy aktiválás (pl. expresszió transzfekcióval történő emelése) valóban az áttétképző sajátságok megváltozását eredményezi egy in vivo rendszerben.

Bőr melanoma progressziós markerek kutatása (2008, új feladat)

Regulátor T-sejtek denzitásának prognosztikus jelentősége a primer tumorban, illetve az őrszemnyirokcsomóban

A CD4+CD25+FOXP3+ regulátor T-sejtek (Treg sejtek) az immunrendszer legjobban jellemzett, az immunreakciók kialakulását gátló hatású szabályozó sejtjei. Az autoimmun és allergiás folyamatok megelőzésében kulcsfontosságúak, és az utóbbi időben igen intenzíven tanulmányozzák szerepüket a daganatok ellen kialakuló immunreakciókban. Bár a betegek vérében és a tumorszövetben a Treg sejtek megnövekedett mennyiségét írták le több ráktípus esetében, nem egyértelmű ezek összefüggése a tumorok progressziójával és a betegség kimenetelével.

Vizsgálataink célja az volt, hogy malignus melanomában szenvedő betegek primer tumorából illetve őrszemnyirokcsomóiból származó szövetmintákban meghatározzuk a FOXP3 Treg-markert hordozó limfociták mennyiségét, és elemezzük a daganatok és betegek jellemzőinek tekintetében. 81 primer melanoma és 23 beteg 43 őrszemnyirokcsomójának immunhisztokémiai feldolgozását végeztük el. A primer melanomákban a FOXP3+ sejtek intra- illetve peritumorális infiltrációját külön-külön értékeltük; egyik sem mutatott összefüggést a tumorvastagsággal, az 5 év követési idő alatt bekövetkezett áttétképzéssel, a betegek túlélésével, vagy bármilyen más vizsgált klinikopatológiai paraméterrel (kor, nem, tumorlokalizáció, szövettani típus, ulceráció).

Az őrszemnyirokcsomók tanulmányozása ezzel szemben érdekes eredményekre vezetett. A mikrometasztázist tartalmazó nyirokcsomókban a FOXP3+ sejtek denzitása meghaladta a tumor-negatívnak diagnosztizált nyirokcsomókat ($p=0,0324$). A betegeket a FOXP3+ limfociták átlagos sűrűsége alapján 2 csoportba osztva az 5 év alatt daganatprogressziót mutató betegek nagyobb hányada került a magasabb átlagdenzitás-értékkel jellemzett csoportba (40% vs. 8%, $p=0,0626$). A Kaplan-Meier-analízis eredménye szerint a FOXP3+ sejtek magas átlagos száma emellett rövidebb túléléssel járt ($p=0,0013$).

Eredményeink arra utalnak, hogy a FOXP3+ limfociták infiltrációja a primer melanomák esetében nem, az őrszemnyirokcsomókban azonban prognosztikus értékű lehet.

Genomikai illetve géntechnológiai eljárások heparánszulfát-proteoglikánok (CD44v3 és syndecan-4) szerepének tisztázására a proliferációban és motilitásban (Dr. Szilák László – Szilák Labor Kft)

A sejtfelszíni syndecan-4 mozgást generál a nyugvó epitheliális sejtekben

Az egészséges szomatikus sejtek többsége helyhez kötött. A rákos elváltozások nagyon sokszor a sejtek mobilitásváltozásával járnak együtt, vagyis a sejtek

újából képesek lesznek az önálló helyváltoztatásra. A metasztázáló rosszindulatú elváltozásoknál ez az első lépés, majd ezt követi az érfal áttörése és a rákos sejtek szétszóródása a testben. Tehát ha meg tudnánk érteni a mozgó fenotípus kialakulásában zajló biokémiai folyamatokat, akkor ezt célzottan gátolhatnánk is, ezzel viszont a metasztázist lehet blokkolni.

Az eddigi vizsgálatunk a syndecan-4 sejtfelszíni transzmembrán fehérjére irányult. Ez a fehérje heparinoldalláncainak köszönhetően szoros kapcsolatban áll az öt körülvevő mátrixszal. A mozgásban fontos fokális adhéziók kialakításában döntő szerepe van, együttműködve az integrinokkal.

A zöld fluoreszcens fehérje (GFP) – syndecan-4 kimerát kódoló plazmidokat elmutáltuk, úgy, hogy a citoplazmás doménben található szerint kicseréltük nem foszforilálható alaninra (Ser179Ala), illetve a foszfoszerint mimikáló glutaminsavra (Ser179Glu). A Ser179Glu mutáns megváltoztatta az eddigi epitheliális morfológiát, vagyis az eddig klaszterben növekvő sejtek laposabbak lettek, kevésbé zártan nőttek, egyenesen szétszóródva a szövettényésztfő flaska alján. Tehát egy ún. epitheliális-mezenchimális átmenetet generált a Ser179Glu mutáció.

A morfológiai változásokat a Rho-GTPázok irányítják

A Rho-GTPázok a kismólsúlyú GTPáz családba tartoznak, legismertebb tagjaik a Rac1, RhoA, Cdc42. Működésük elve, hogy GTP (trifoszfát) kötődéskor alakul ki az aktív konformációjuk, ami a belső GTPáz hatás következtében GDP-vé (difoszfáttá) hidrolizál. Az aktív fehérjék bekötődnek az effektor fehérjékbe, amik igen széles spektrumúak, kinázok, szintázok, hidrolázok, stb. tartoznak ide. A GDP-kötött fehérje a megváltozott konformáció következtében disszociál az effektorról, ami ezáltal elveszti működőképességét.

Egy mozgó sejtben a RhoA aktív, aminek fontos szerepe van a mozgásban nélkülözhetetlen akto-miozin stresszrostok kialakításában. A Rac1-szint általában magas a nyugvó epitheliális sejtekben.

Vizsgálataink során rájöttünk, hogy a syndecan-4 foszforilációtól függően képes befolyásolni az aktív Rac1 koncentrációját, ezzel befolyásolni a sejtek mozgáskéességét. A foszforilált syndecan-4, ill. az ezt a formát mimikáló glutaminsavas mutáns (Ser179Glu) lecsökkentette a Rac1-szintet.

Eddigi eredményeink: a magyar szabadalmi bejelentés – P0600578 – PCT/IB2007/052787 számmal, „Sejtmagi fehérje transzport / Intracellular targeting of molecules” – címmel nemzetközi szakaszba került. Egy új szabadalom került benyújtásra P0800464 számmal „Syndecan-4 Rac1-GTP modulátor/ Syndecan-4 a modulátor of Rac1-GTP” címmel.

4. SZÁMÚ PROGRAMCSOMAG: TERÁPIA-INDIVIDUALIZÁLÁS FARMAKOGENOMIKAI MÓDSZEREKKEL

*Növekedési faktor receptor és hormonreceptor kölcsönhatás
farmakogenomikája emlő- és fej-nyaki daganatokban
(Dr. Csuka Orsolya – Országos Onkológiai Intézet)*

*Hormon- és növekedési faktor receptor expressziós mintázat
jelentőségének meghatározása a csontáttétek kialakulásában*

Az emlőrákok progressziójának egyik kitüntetett helye a csont, ami sokszor évekkel vagy évtizedekkel a primer tumor eltávolítása után következik be. Az ekkor meghatározandó terápiás döntések gyakorlatilag a primer tumor rendelkezésre álló paraffinos blokkjainak elemzésével történnek. A többféle terápiás modalitás közül a csontáttétekre specifikus biszfoszfonát illetve a genetikai státusz által meghatározott anti-HER2 molekuláris terápia mellett a hormonreceptor-expresszió alapján indikált anti-ösztrogén terápia gyakorlatilag a primer tumor geno-fenotípusának ismeretében történik. Ez nyilvánvaló nonszensz, hisz az eltelt évek, évtizedek alatt az alvó daganatsejtek nem biztos, hogy továbbra is hasonlóak maradnak, nagy az esélye annak, hogy ezek a paraméterek változnak és ezzel az új állapottal ellentétes terápiás döntések születnek. Sajnálatosan kevés vizsgálat zajlik annak ellenőrzésére, vajon az áttéti emlőrákban mennyiben kell számolni a genotípusváltással. Jelenleg 3 elmélet létezik, mely modellezi a daganatprogresszió során a genetikai változásokat: az egyik szerint az áttétek gyakorlatilag megőrzik geno-fenotípusukat (same gene modell), a másik ezzel teljesen ellentétes modell szerint az áttétek teljesen eltérő geno-fenotípussal rendelkezhetnek (parallel evolution), illetve a kompromisszumos modell, amely a klonális szelekcióra épül. Hogy egy adott daganatféleség adott szervi áttétére mely modell vonatkozik, igen kevés adatunk van, különösen áll ez az emlőrák csontáttéteire.

Az elmúlt időszakban 48 csontáttétes esetben elemeztük az emlőrák genotípusváltozását a primer tumorhoz képest. A HER2-státuszt FISH-vizsgálattal molekuláris genetikai eszközökkel határoztuk meg, míg a daganatok erezettségét és ER/PgR-státuszát immunhisztokémiailag vizsgáltuk.

A primer emlőrákok esetében 17,4% gyakorisággal igazoltunk HER2-amplifikációt, míg a csontáttétekben 10,4%-ban. Ez meglepő volt, hiszen sok adat azt sugallta, hogy a HER2-amplifikációs állapot stabil volna az emlőrák progressziója során. A kérdés ugyanakkor az volt, hogy az individuális esetekben hogyan változik a HER2-státusz, ezért 23 primer tumor/csonthatát pár esetében hasonlítottuk össze a HER2-státuszt. Az esetek 78,3%-ában a kezdeti HER2-negatív státusz továbbra is fennállt a csontáttétekben. Ugyanakkor érdekesen alakult a HER2-amplifikált emlőrákok helyzete: a 4

amplifikált primer tumor közül csak 2 őrizte meg ezt a genotípusát a csontáttétekben.

Ez azt jelenti, ha extrapoláljuk ezeket az adatokat, hogy a HER2-amplifikált emlőrákok csontáttéteinek esetében 50%-os valószínűséggel tudjuk csak megjósolni a genetikai státuszt a primer tumor vizsgálata alapján. Ugyanakkor a HER2-negatív emlőrákok esetében nem kell számolnunk a genotípus ilyen tekintetben bekövetkező változásával. Ezen adatok alapján az a szakmai ajánlás tűnik célravezetőnek, hogy a HER2-amplifikált emlőrákok esetében törekedni kell az áttéti szövetből nyert minta alapján megismételni a HER2-vizsgálatot, hogy az igen költséges Herceptin vagy egyéb célzott terápiát minnél inkább indokoltan indikáljuk.

A másik kérdés az volt, vajon mi a helyzet az ER/PgR-fenotípussal, hiszen a kezelés egyik alapja a progrediáló emlőrák esetében is az anti-ösztrogén terápia, ha funkcionáló ER-expresszió áll fenn. Korábban már kisebb klinikai mintákon megkísérelték elemezni ezt a folyamatot, és arra utaltak az adatok, hogy az ER/PgR-státusz változik, gyakorlatilag csökken vagy elvész a hormonreceptor-expresszió. Ezt elemeztük 23 csontáttét/primer tumor mintán immunhisztokémia segítségével. A primer tumorok 72,2%-ában ER+ fenotípus állt fenn, ami azonban jelentősen megváltozott az áttétekben, ahol csak 22,2%-os volt, drámai módon lecsökkent, gyakorlatilag azzal kell számolni, hogy az ER+ emlőrákok 2/3-ában elvész a receptorexpresszió a csontáttétekben. Itt is azt lehet mondani, hogy ezek a vizsgálatok is azt vetítik előre, hogy célszerű a (csont)áttéteket újra megvizsgálni a hormonreceptor-expressziós státusz szempontjából is, hogy nem a bizonytalan primer tumor, hanem az áttéti szövet státusza adja a terápiás döntés alapját.

Miután az antiangiogén terápia belépett az előrehaladott emlőrákok kezelésébe, megvizsgáltuk a csontáttétek érdenzítését és VEGF-expresszióját is a primer tumor vonatkozásában. Az érdenzítésváltozás inkonkluzívnak bizonyult, mert minden irányú eltérés előfordult a csontáttétekben. A VEGF-fenotípus a primer tumorban 55,6%-ban pozitív volt, ami csak minimálisan változott a csontáttétekben (44,4%). Ennek alapján feltűnő, hogy gyakorlatilag az emlőrákok fele VEGF-fehérje-negatív, ami elgondolkodtató az anti-VEGF terápia indikálása szempontjából. Ugyanakkor az esetek 33,3%-ában megőrzi az emlőrák csontáttéteiben a VEGF-expressziót. Fontos új megfigyelésünk, hogy hasonló gyakorisággal változik a VEGF-expressziós típus (33,3%): ebből gyakoribb a VEGF-expresszió elvesztése (22,2%), de az is előfordul (11,1%-ban), hogy a primer tumorban negatív fenotípus megfordul és megjelenik a VEGF protein. Az adatokat elemeztük abból a szempontból is, hogy a primer tumor utáni kezelések mennyiben befolyásolják a csontáttét érdenzítését: adataink szerint amennyiben nem történik semmilyen kezelés, akkor az áttét érdenzítése szignifikánsan emelkedik, míg a hormonterápia vagy kemoterápia eredménye-

ként a kialakuló daganat szignifikánsan csökkent érdenzítással rendelkezik.

Összefoglalóan azt lehet mondani, hogy a csontátétes emlőrákok esetében, ha a beteg korábban terápiában részesült, az angiogén fenotípus gyengülésével kell számolni, míg a kezeletlen esetekben egy fokozott angiogén fenotípussal, mely esetleg sokkal érzékenyebb lehet az antiangiogén terápiák iránt.

Daganatok antraciklin-terápiájának monitorozása non-invazív molekuláris képalkotó eljárással
(Dr. Kásler Miklós – Országos Onkológiai Intézet)

Antraciklin tumorszövetben való kimutatása humán metasztatikus emlőrákban

Antraciklin szöveti jelenlétének tesztelése non-invazív képalkotó eljárással neoadjuváns kezelésben részesülő emlő-, illetve rectumrákos betegekben

Klinikai vizsgálatok

Megkezdett klinikopatológiai tanulmányainkat folytattuk 35 előrehaladott stádiumú emlőrákos betegen, akik a sebészi kezelést megelőzően neoadjuváns kemoterápiát kaptak. A vizsgálatban első lépésként képalkotó vizsgálattal, majd core-biopsziával diagnosztizálták az emlőrákot, majd a betegeket antraciklin-tartalmú (Epirubicin-FEC, Adriamicin-FAC protokoll) kemoterápiás kombinációkkal kezelték 4 ciklusban 12 héten át (a kumulatív antraciklin-dózis 200 mg/m²). Az utolsó antraciklin-tartalmú kezelést követően a 7. napon történt meg a műtét. Az antraciklin-specifikus vörös fluoreszcenciát (gerjesztés 499 nm, emisszió 559 nm) a primer diagnosztikus core-biopsziában (mint negatív kontroll), illetve a daganat műtési anyagában elemeztük. A formalin-fixált paraffinos metszeteket deparaffináltuk, majd ezt a natív készítményt fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk a háttér zöld fluoreszcencia segítségével (strukturális orientáció). A mintákban a vvt meglehetősen intenzív zöld és gyengébb vörös fluoreszcenciát mutatott. A kezdő core-biopsziákban egyetlen esetben sem észleltünk a vvt-ken kívül más sejtes elem esetében erős magi vagy citoplazmatikus fluoreszcenciát (0/35). Ugyanakkor valamennyi műtési minta esetében észleltünk specifikus szöveti fluoreszcenciát, amit vagy magukban a daganatsejtekben találtunk (16/35, 45,7%), vagy a daganatsejtfészkek körüli makrofágok citoplazmájában (19/35, 54,3%), vagy a pusztuló daganatsejtek citoplazmájában (17/35, 48,6%). A műtési mintákban lévő reziduális daganatszövetet alkotó daganatsejtek többségében specifikus magi antraciklin-fluoreszcencia nem volt jelen. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az antraciklin-származékokkal kezelt emlőrákokban vagy a reziduális daganatszövetben, vagy a stromális makrofágokban fluoreszcens módszerrel kimutatható a gyógyszer, ami megnyitja az utat az antraciklin-detektor kialakítása irányába.

Antraciklin-detektáló teljes-állat képalkotó tesztelése

A korábban meghatározott paraméterek alapján egy kisállat-fluoreszcencia készüléket módosítottunk az antraciklin-származékok kimutatására. A gerjesztő fény hullámhosszát a patológiai vizsgálatban is használt 499 nm-ben, míg az emissziós fény hullámhosszát az 559 nm-ben határoztuk meg. A SCID egereket elsőként antraciklinnel kezeltük 30 percig, majd elemeztük, hogy a felszínes jól vaszkularizált bőrben detektálható-e a fluoreszcencia.

Vizsgálatunk alapján megállapítható, hogy a fluoreszcens kamera rendszerrel mm-es felbontásban észlelhető a specifikus antraciklin-fluoreszcencia SCID eger bőrére, illetve alatta a kitágult kapilláris hálózatban. A detektálási távolság (bőr-kamera távolság) 10 cm volt, ami reális humán viszonyok esetében is.

Vastagbélrák kemoterápiájának farmakogenomikája
(Dr. Kralovánszky Judit – Országos Onkológiai Intézet)

Új gyógyszerkombinációk tervezése és experimentális vizsgálata CRC-ban

A jelentés nem publikált eredményeket tartalmaz, melynek előzetes megjelentetéséhez a témavezető szabadalomjogi okokból nem járult hozzá.

IRODALOM

1. számú program

- Antoniou AC, Cunningham AP, ... Oláh E, et al. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer: updates and extensions. *Br J Cancer* 98:1457–1466, 2008
- Linger R, Dudakia D, ... Oláh E, et al. Analysis of the DND1 gene in men with sporadic and familial testicular germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 47:247–252, 2008
- Nagahashi M, Ajioka Y, Lang I, Szentirmay Z, et al. Genetic changes of p53, K-ras, and microsatellite instability in gallbladder carcinoma in high-incidence areas of Japan and Hungary. *World J Gastroenterol* 14:70–75, 2008
- Illés A, Simon Z, Tóth E, et al. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma (NLPHL) – Clinicopathological features based on the data of two Hungarian lymphoma centres. *Pathol Oncol Res* 14:411–421, 2008
- Szöke J, Csernák E, Szentirmay Z. Mutational analysis of the epidermal growth factor receptor gene in clinical samples of adenocarcinoma of the lung. *Revis Med Farmac* 54(Suppl 3):495–498, 2008
- Kovács ME, Papp J, Szentirmay Z, et al. Deletions removing the last exon of TACSTD' constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 30:197–203, 2009

2. számú program

- Dome B, Dobos J, Tóvári J, et al. Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells: characterization, mobilization and therapeutic considerations in malignant disease. *Cytometry A* 73:186–193, 2008
- Lövey J, Bereczky B, Gilly R, et al. Recombinant human erythropoietin-alpha improves the efficacy of radiotherapy of a human tumor xenograft, affecting tumor cells and microvessels. *Strahlenther Oncol* 184:1–7, 2008

- Amir E, Hughes S, Blackhall F, et al. Targeting blood vessels for the treatment of non-small cell lung cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 8:392–403, 2008
- Dome B, Timar J, Ladanyi A, et al. Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: from biology to therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 69:108–124, 2009
- Bogos K, Renyi-Vamos F, Dobos J, et al. High VEGFR-3-positive circulating lymphatic/vascular endothelial progenitor cell level is associated with poor prognosis in human small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 15:1741–1746, 2009
- Tímár J, Döme B. Antiangiogenic drugs and tyrosine kinases. *Anti-cancer Agents Med Chem* 5:462–469, 2008
- Tóvári J, Pirker R, Tímár J, et al. Erythropoietin in cancer: an update. *Curr Mol Med* 8:481–491, 2008
- Dome P, Teleki Z, Rihmer Z, et al. Circulating endothelial progenitor cells and depression: a possible novel link between heart and soul. *Mol Psychiatry* 14:523–531, 2009

3. számú program

- Tímár J, Győrffy B, Rásó E. Gene signature of the metastatic potential of cutaneous melanoma. *Clin Exp Metast* 2009 (in press)

4. számú program

- Réti A, Barna G, Pap E, et al. Enhancement of 5-fluorouracyl efficacy on high COX-2 expressing HCA-7 cells by low dose indomethacin and NS-398 but not on low COX-2 expressing HT-29 cells. *Pathol Oncol Res* 2008 doi:1007/s12253-008-9126-9
- Kralovánszky J. Törekvések a daganatkemoterápia hatékonyságának fokozására. *Magyar Onkológia* 52:9–18, 2008
- Komlósi V, Budai B, Adleff V, et al. Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) C1420T and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphisms in colorectal cancer and their influence on the serum homocysteine level. *Eur J Hum Genet*, Manuscript number: 740-08-EWJHG (Submitted 2008)
- Bácsi K, Hitre E, Kósa JP, et al. Effects of the lactase 13910C/T and calcium-sensor receptor A986S G/T gene polymorphisms on the incidence and recurrence of colorectal cancer in Hungarian population. *BMC Cancer* 8: 317, 2008, doi:10.1186/1471-2407.8-317